



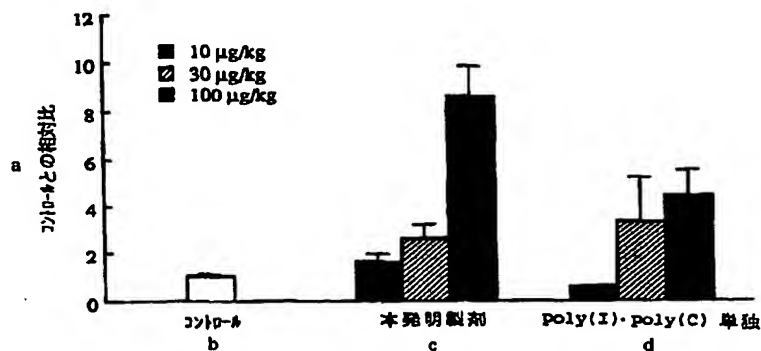
PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

| | | | |
|--|--|--|------------------------------------|
| (51) 国際特許分類 A61K 47/24, 47/18, 9/127, 31/70 | | A1 | (11) 国際公開番号 WO99/48531 |
| | | | (43) 国際公開日 1999年9月30日(30.09.99) |
| (21) 国際出願番号 PCT/JP99/01438 | | (81) 指定国 AU, BR, CA, CN, HU, ID, IL, JP, KR, MX, NO, NZ, RU, UA, US, VN, ZA, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM) | |
| (22) 国際出願日 1999年3月23日(23.03.99) | | | |
| (30) 優先権データ 特願平10/76055 1998年3月24日(24.03.98) JP | | 添付公開書類 国際調査報告書 | |
| <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 日本新薬株式会社(NIPPON SHINYAKU CO., LTD.)(JP/JP) 〒601-8550 京都府京都市南区吉祥院西ノ庄門口町14番地 Kyoto, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 平林加壽子(HIRABAYASHI, Kazuko)(JP/JP) 〒616-8105 京都府京都市右京区太秦森ヶ前町11-1 グリーンパレス蚕の社307 Kyoto, (JP)</p> <p>関 純造(SEKI, Junzo)(JP/JP) 〒567-0032 大阪府茨木市西駅前町13番11号 Osaka, (JP)</p> | | | |

(54)Title: REMEDIES FOR HEPATITIS

(54)発明の名称 肝炎治療剤



a ... RELATIVE RATIO TO CONTROL
b ... CONTROL
c ... INVENTION PREPARATION
d ... poly(I)·poly(C) alone

(57) Abstract

Novel drugs efficacious in treating and preventing hepatitis. These drugs are remedies or preventives for hepatitis characterized by containing a complex of a drug carrier comprising as the essential components, for example, 2-0-(2-diethylaminoethyl)carbamoyl-1,3,0-dioleoyl glycerol and a phospholipid with poly(I).poly(C).

本発明の目的は、肝炎の治療や予防に有効な新規な薬剤を提供することにある。

本発明は、例えば、2-0-(2- ジエチルアミノエチル) カルバモイル-1,3-0- ジオレオイルグリセロール及びリン脂質を必須構成成分として形成される薬物担体と $\text{poly(I)} \cdot \text{poly(C)}$ との複合体を含有することを特徴とする肝炎治療剤又は予防剤である。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

| | | | | | | | |
|----|--------------|----|---------|----|-------------------|----|------------|
| AE | アラブ首長国連邦 | DM | ドミニカ | KZ | カザフスタン | RU | ロシア |
| AL | アルバニア | EE | エストニア | LC | セントルシア | SD | スーダン |
| AM | アルメニア | ES | スペイン | LI | リヒテンシュタイン | SE | スウェーデン |
| AT | オーストリア | FI | フィンランド | LK | スリ・ランカ | SG | シンガポール |
| AU | オーストラリア | FR | フランス | LR | リベリア | SI | スロヴェニア |
| AZ | アゼルバイジャン | GA | ガボン | LS | レソト | SK | スロヴァキア |
| BA | ボスニア・ヘルツェゴビナ | GB | 英国 | LT | リトアニア | SL | シエラ・レオネ |
| BB | バルバドス | GD | グレナダ | LU | ルクセンブルグ | SN | セネガル |
| BE | ベルギー | GE | グルジア | LV | ラトヴィア | SZ | スワジランド |
| BF | ブルキナ・ファソ | GH | ガーナ | MA | モロッコ | TD | チャード |
| BG | ブルガリア | GM | ガンビア | MC | モナコ | TG | トーゴ |
| BJ | ベナン | GN | ギニア | MD | モルドヴァ | TJ | タジキスタン |
| BR | ブラジル | GW | ギニア・ビサウ | MG | マダガスカル | TZ | タンザニア |
| BY | ベラルーシ | GR | ギリシャ | MK | マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国 | TM | トルクメニスタン |
| CA | カナダ | HR | クロアチア | | | TR | トルコ |
| CC | 中央アフリカ | HU | ハンガリー | ML | マリ | TT | トリニダード・トバゴ |
| CG | コンゴ | ID | インドネシア | MN | モンゴル | UA | ウクライナ |
| CH | スイス | IE | アイルランド | MR | モリタニア | UG | ウガンダ |
| CI | コートジボワール | IL | イスラエル | MW | マラウイ | US | 米国 |
| CM | カメルーン | IN | インド | MX | メキシコ | UZ | ウズベキスタン |
| CN | 中国 | IS | アイスランド | NE | ニジェール | VN | ヴェトナム |
| CR | コスタ・リカ | IT | イタリア | NL | オランダ | YU | ユーゴスラビア |
| CU | キューバ | JP | 日本 | NO | ノルウェー | ZA | 南アフリカ共和国 |
| CY | キプロス | KE | ケニア | NZ | ニュージーランド | ZW | ジンバブエ |
| CZ | チェッコ | KG | キルギスタン | PL | ポーランド | | |
| DE | ドイツ | KP | 北朝鮮 | PT | ポルトガル | | |
| DK | デンマーク | KR | 韓国 | RO | ルーマニア | | |

明 細 書

肝炎治療剤

技 術 分 野

本発明は、肝炎治療剤に関するものである。

ここで「I」とはイノシン酸を、「C」とはシチジル酸を、「A」とはアデニル酸を、「U」とはウリジル酸を、それぞれ意味する。

ミスマッチド poly(I)·poly(C) 、ミスマッチド poly(A)·poly(U) とは、当業者に周知の用語であるが、二本鎖を構成する核酸塩基の中に一部相補的でない塩基を含む poly(I)·poly(C) 、 poly(A)·poly(U) を意味する。

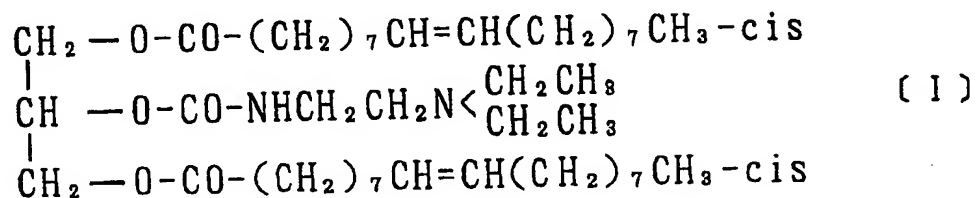
背 景 技 術

poly(I)·poly(C) は、ポリイノシン酸とポリシチジル酸とからなる二本鎖RNAであり、インターフェロン誘導能や免疫賦活作用を有する薬物として広く知られている。

インターフェロンそのものは、現在、C型肝炎の治療に有効であると報告されている（例、肝胆脾、9(4), 611 (1984)、同 13(1), 123 (1986)、同 12(5), 809 (1986)、同 23(5), 1065 (1991)）。しかし、かかるインターフェロンを誘導することができる上記 poly(I)·poly(C) を通常の手法によって投与することにより、肝炎を治療しようとしても、その誘導量の程度や毒性等から困難であると考えられている。

一方、いわゆるカチオン性リポソームと一般に呼ばれる、リポフ

ェクチン（登録商標）なる薬物担体や下記の構造式〔I〕に係る2-0-(2- ジエチルアミノエチル) カルバモイル-1,3-0- ジオレオイルグリセロール等のグリセロール誘導体とリン脂質とを必須構成成分として形成される薬物担体等が知られている（例、PCT W091/17424号公報、PCT W094/19314号公報）。



上記カチオン性リポソームは、脂質二分子膜からなる、水溶液中で正電荷を持った小胞体であると考えられている。かかるカチオン性リポソームは水溶液中で正電荷を帯び、p o l y (I)・p o l y (C)等の二本鎖RNAは水溶液中で負電荷を帯びることから、常法により分散処理することによって、カチオン性リポソームとp o l y (I)・p o l y (C)等とは容易に複合体を形成することができる。

このような薬物担体とp o l y (I)・p o l y (C)等の二本鎖RNAとの複合体が肝炎の治療等に有効であることは全く知られていない。

発 明 の 開 示

本発明の目的は、肝炎の治療や予防に有効な新規な薬剤を提供することにある。

本発明者らは、カチオン性リポソームのような薬物担体と

p o l y (I)・p o l y (C) 等の二本鎖RNAとの複合体が、肝臓や脾臓に特異的に集まり、そこで肝炎の治療等に有効なインターフェロンを長時間誘導し得ることを初めて見だし、本発明を完成した。

本発明は、一つには、カチオン性リポソームとp o l y (I)・p o l y (C) 等の二本鎖RNAとの複合体（以下「本複合体」という）を含有することを特徴とする肝炎治療剤又は予防剤（以下「本発明製剤」という）である。

以下、本発明を詳述する。

本発明に適用しうる「カチオン性リポソーム」としては、リポフェクチン（登録商標）、リポフェクトアミン（登録商標）、リポフェクトエース（登録商標）、DMRIE-C（登録商標）の他に、PCT WO 94/19314号公報に開示されている薬物担体、例えば、前記化学式〔I〕の2-0-(2- ジエチルアミノエチル) カルバモイル-1,3-0- ジオレオイルグリセロール（以下「化合物A」という）及びリン脂質を必須構成成分として形成される薬物担体などを挙げることができる。

本発明において好ましいカチオン性リポソームとしては、化合物A及びリン脂質を必須構成成分として形成される薬物担体（以下、この薬物担体を「本担体」という）を挙げることができる。

本発明に適用しうる二本鎖RNAとしては、例えば、p o l y (I)・p o l y (C)、ミスマッチドp o l y (I)・p o l y (C)、p o l y (A)・p o l y (U)、ミスマッチドp o l y (A)・p o l y (U) を挙げることができる。この中、p o l y (I)・p o l y (C) が適当である。

上記二本鎖RNAの鎖長は、特に制限されないが、50～2,000bp (bp: ベースペア、塩基対数) の範囲内にあるものが適当であり、100～500bp の範囲内にあるものが好ましく、200～400bp の範囲内にあるものがより好ましい。50bp未満であると有効性に問題が生じるおそれがあり、2,000bp より長いと安全性に問題が生じるおそれがある。100～500bp の範囲内にあるものは、本発明において有効性と安全性とのバランスがとれている鎖長領域であると考えられる。poly(I)・poly(C) についても100～500bp の範囲内にあるものが好ましく、200～400bp の範囲内にあるものがより好ましい。なお、poly(I)・poly(C) 等の二本鎖RNAは、通常様々な鎖長からなる一定の分布をもって存在するので、前記各鎖長は最大分布の塩基対数を意味し、ここでは「平均鎖長」という。

本担体中のリン脂質としては、医薬上許容されるリン脂質であれば特に制限されず、具体例としては、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジイルイノシトール、ホスファチジルセリン、スフィンゴミエリン、レシチン等を挙げることができる。また、水素添加されたリン脂質も挙げることができる。好ましいリン脂質としては、卵黄ホスファチジルコリン、卵黄レシチン、大豆レシチン、卵黄ホスファチドを挙げることができる。2種以上のリン脂質を用いることもできる。なお、化合物Aにおいては、ホスファチジルコリン又はレシチンの方が、カチオン性リポソームにおいて一般的に用いられるホスファチジルエタノールアミンよりも優れている。

好ましい本発明としては、従って、リン脂質がレシチンである本

担体と、平均鎖長が 100～ 500bp（特に 200～ 400bp）の範囲内にある p o l y (I)・p o l y (C) との複合体に係る本発明製剤を挙げることができる。

カチオン性リポソームと二本鎖RNAとの構成比率は、カチオン性リポソームや二本鎖RNAの種類や鎖長、肝炎の種類や程度等によって異なるが、カチオン性リポソーム10重量部に対して、二本鎖RNA 0.05～10重量部が適当であり、0.1～4重量部が好ましく、0.5～2重量部がより好ましい。本担体と p o l y (I)・p o l y (C) との構成比率も同様に、本担体10重量部に対して、p o l y (I)・p o l y (C) 0.05～10重量部が適当であり、0.1～4重量部が好ましく、0.5～2重量部がより好ましい。

本担体中の、化合物Aとリン脂質との構成比率は、二本鎖RNAの種類や鎖長、使用量、またリン脂質によって異なるが、化合物A 1重量部に対して、リン脂質 0.1～10重量部が適当であり、0.5～5重量部が好ましく、1～2重量部がより好ましい。

本発明製剤は、例えば、本複合体が水溶液中に分散している液剤（注射剤、点滴剤等）やその凍結乾燥製剤の形態をとることができる。液剤の場合、本複合体が、0.001～25%（w/v）の濃度範囲内で存在しているものが適当であり、0.01～5%（w/v）の濃度範囲内で存在しているものが好ましく、0.1～1%（w/v）の濃度範囲内で存在しているものがより好ましい。

本発明製剤は、医薬上許容される任意の添加剤、例えば、乳化補助剤、安定化剤、等張化剤、pH調整剤を適当量含有していてもよい。具体的には、炭素数6～22の脂肪酸（例、カプリル酸、カプ

リン酸、ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸、アラキドン酸、ドコサヘキサエン酸）やその医薬上許容される塩（例、ナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩）、アルブミン、デキストラン等の乳化補助剤、コレステロール、ホスファチジン酸等の安定化剤、塩化ナトリウム、グルコース、マルトース、ラクトース、スクロース、トレハロース等の等張化剤、塩酸、硫酸、リン酸、酢酸、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、トリエタノールアミン等のpH調整剤などを挙げることができる。

本発明製剤は、例えば、リポソームの一般的な製法と同様にして製造することができる。例えば、カチオン性リポソーム又はその原料（例えば、化合物Aとリン脂質）とpoly(I):poly(C)等の二本鎖RNAとを水溶液中で分散処理することにより製造することができる。水溶液としては、注射用水、注射用蒸留水、生理食塩水等の電解質液、ブドウ糖液等を挙げることができる。分散処理は、適当な分散機、例えば、ホモミキサー、ホモジナイザー、超音波分散器、超音波ホモジナイザー、高圧乳化分散機、マイクロフルイダイザー（商品名）、ナノマイザー（商品名）、アルティマイザー（商品名）、マントン-ガウリン型高圧ホモジナイザーを用いて行うことができる。また、当該分散処理は、粗分散を経るなど数段階に分けて行うこともできる。

カチオン性リポソームは、市販のものをそのまま又は適当に加工して用いることができる。

カチオン性リポソームの原料から本発明製剤を製造する場合は、

当該原料に p o l y (I): p o l y (C) 等の二本鎖RNAを加え、一緒に分散処理することができる他、当該原料をまず分散処理してカチオン性リポソームを形成させ、続いて p o l y (I): p o l y (C) 等の二本鎖RNAを加え再度分散処理して本発明製剤を製造することもできる。

医薬上許容される任意の添加剤は、分散前でも分散後でも適当な工程で添加することができる。

次いで、上記分散処理して得られた本発明製剤を凍結乾燥処理すれば、本発明製剤の凍結乾燥製剤を調製することができる。凍結乾燥処理は、常法により行なうことができる。例えば、上記分散処理して得られた本発明製剤を滅菌後、所定量をバイアル瓶に分注する。約 $-40 \sim -20^{\circ}\text{C}$ の条件で予備凍結を約2時間程度行い、約 $0 \sim 10^{\circ}\text{C}$ で減圧下に一次乾燥を行い、次いで、約 $15 \sim 25^{\circ}\text{C}$ で減圧下に二次乾燥して凍結乾燥する。そして、一般的にはバイアル内部を窒素ガスで置換し、打栓して本発明製剤の凍結乾燥製剤を得ることができる。

本発明製剤の凍結乾燥製剤は、一般には任意の適当な溶液（再溶解液）の添加によって再溶解し使用することができる。このような再溶解液としては、注射用水、生理食塩水等の電解質液、ブドウ糖液、その他一般輸液を挙げることができる。この再溶解液の液量は、用途等によって異なり特に制限されないが、凍結乾燥前の液量の $0.5 \sim 2$ 倍量、又は 500 mL 以下が適当である。

本発明製剤は、p o l y (I): p o l y (C) 等の二本鎖RNAを単独で投与するよりも肝臓や脾臓で特異的に集まり、そこでβインタ

ーフェロンを長時間多量に誘導することができるので、ヒトを含む動物の肝炎の治療又は予防に有効である。また、リン脂質がレシチンである本担体と、平均鎖長が 100～500bp（特に200～400bp）の範囲内にある $\text{poly(I)}:\text{poly(C)}$ との複合体に係る本発明製剤は、有効性を保持しつつ毒性が極めて低いので、とりわけ優れている。

本発明製剤は、例えば、静脈内投与、経粘膜投与、肝動脈内投与することができる。

本発明製剤の肝炎治療のための投与量は、二本鎖RNAやリン脂質の種類、肝炎の種類や進行状況、患者の年齢、動物種差、投与経路、投与方法等によって異なるが、二本鎖RNAの投与量として、1回当たり通常 $1\mu\text{g} \sim 50\text{mg}$ /ヒトが適当であり、 $10\mu\text{g} \sim 10\text{mg}$ /ヒトが好ましい。 $\text{poly(I)} \cdot \text{poly(C)}$ の投与量としても、1回当たり通常 $1\mu\text{g} \sim 50\text{mg}$ /ヒトが適当であり、 $10\mu\text{g} \sim 10\text{mg}$ /ヒトが好ましい。本発明製剤は、1日1～3回を、連日、隔日、1週毎、2週毎等に1ショット投与や点滴投与等することができる。

発明を実施するための最良の形態

以下、実施例及び試験例を掲げて、本発明を更に詳しく説明する。各実施例及び各試験例において、本発明製剤の濃度は、すべて本発明製剤中の当該 $\text{poly(I)} \cdot \text{poly(C)}$ の濃度で表している。

実施例 1

化合物A 2gと精製卵黄レシチン2gに100mLの注射用水に溶解したマルトース40gを加え攪拌混合し、ホモジナイザーを用いて5分間分散処理して本担体の粗分散液を得た。かかる粗分散液

を更に実験用小型乳化分散機を用いて1時間分散処理し、注射用水で250 mLに定容して本担体分散液を回収した。本担体分散液250 mLに500 mgのpoly(I)・poly(C)〔平均鎖長は、約200bp〕を含む150 mLの水溶液を攪拌しながら添加し、更に1時間実験用小型乳化分散機を用いて分散処理し本発明製剤を得た。その後、本発明製剤を1 mLずつバイアルに分注し常法に従って凍結乾燥製剤とした。

実施例 2

化合物A 50 gと卵黄ホスファチド30 gに10 Lの注射用水に溶解したスクロース4 kgを加えマントソーガウリン型高圧ホモジナイザーを用いて10分間分散処理し、注射用水で25 Lに定容して本担体分散液を回収した。本担体分散液20 Lに10 gのpoly(I)・poly(C)〔平均鎖長は、約200bp〕を含む12 Lの水溶液を攪拌しながら添加し、塩酸を用いてpHを5.5に調整し、さらに30分マントソーガウリン型高圧ホモジナイザーを用いて分散処理して本発明製剤を得た。その後、本発明製剤を20 mLずつバイアルに分注し常法に従って凍結乾燥製剤とした。当該凍結乾燥製剤に市販の5%ブドウ糖輸液(500 mL)を加えて溶解した。

実施例 3

化合物A 2 gと大豆レシチン2 gに100 mLの注射用水に溶解したブドウ糖20 gを加え攪拌混合し、ホモジナイザーを用いて5分間分散処理して本担体の粗分散液を得た。かかる粗分散液を更に実験用小型高圧乳化分散機を用いて1時間分散処理し、注射用水で

250 mLに定容して本担体分散液を回収した。本担体分散液250 mLに50 mgのpoly(I)・poly(C)〔平均鎖長は、約200bp〕を含む150 mLの水溶液を攪拌しながら添加し、さらに1時間実験用小型高圧乳化分散機を用いて分散処理して本発明製剤を得た。

実施例 4

化合物A 1.2 gと精製卵黄レシチン2.0 gに100 mLの注射用水に溶解したマルトース40 gを加え攪拌混合し、実験用小型乳化分散機を用いて30分間分散処理し、注射用水で250 mLに定容して本担体分散液を回収した。本担体分散液250 mLに200 mgのpoly(I)・poly(C)〔平均鎖長は、約200bp〕を含む150 mLの水溶液を攪拌しながら添加し、さらに2時間実験用小型乳化分散機を用いて分散処理して本発明製剤を得た。

実施例 5

化合物A 1.2 gと精製卵黄レシチン2.0 gに100 mLの注射用水に溶解したマルトース40 gを加え攪拌混合し、実験用小型乳化分散機を用いて30分間分散処理し、注射用水で250 mLに定容して本担体分散液を回収した。本担体分散液250 mLに、平均鎖長が360ベースのpoly(I) 100 mgと318ベースのpoly(C) 100 mgを含む150 mLの水溶液を攪拌しながら添加し、さらに2時間実験用小型乳化分散機を用いて分散処理して本発明製剤を得た。

実施例 6

化合物A 2 gと精製卵黄レシチン2 gに100 mLの注射用水に

溶解したマルトース 40 g を加え攪拌混合し、ホモジナイザーを用いて 5 分間分散処理して本担体の粗分散液を得た。かかる粗分散液を更に実験用小型乳化分散機を用いて 1 時間分散処理し、注射用水で 250 mL に定容して本担体分散液を回収した。本担体分散液 250 mL に、平均鎖長が 1419 ベースの poly(I) 250 mg と 1491 ベースの poly(C) 250 mg を含む 150 mL の水溶液を攪拌しながら添加し、更に 1 時間実験用小型乳化分散機を用いて分散処理し本発明製剤を得た。その後、本発明製剤を 1 mL ずつバイアルに分注し常法に従って凍結乾燥製剤とした。

実施例 7

化合物 A 1.2 g と精製卵黄レシチン 2.0 g に 100 mL の注射用水に溶解したマルトース 40 g を加え攪拌混合し、実験用小型乳化分散機を用いて 30 分間分散処理し、注射用水で 250 mL に定容して本担体分散液を回収した。本担体分散液 250 mL に、平均鎖長が 84 ベースの poly(I) 100 mg と 76 ベースの poly(C) 100 mg を含む 150 mL の水溶液を攪拌しながら添加し、さらに 2 時間実験用小型乳化分散機を用いて分散処理して本発明製剤を得た。

実施例 8

実施例 4 と同様にして、平均鎖長が約 350bp の poly(I) ・ poly(C) を含む本発明製剤を得た。

実施例 9

実施例 4 と同様にして、平均鎖長が約 1450bp の poly(I) ・ poly(C) を含む本発明製剤を得た。

実施例 10

実施例 4 と同様にして、平均鎖長が約 80bp の p o l y (I) ・ p o l y (C) を含む本発明製剤を得た。

試験例 1 マウスの肝臓における β インターフェロン誘導効果
(in vivo)

雄性マウス (Balb/c, 5 週齢) 一群 3 匹に実施例 4 に係る本発明製剤又は対照としての p o l y (I) ・ p o l y (C) 単独製剤を静脈内に投与し、3 時間後に肝臓を摘出した。そして、AGPC 法 (The acid-guanidine-phenol-chloroform 法) により全 RNA を抽出し、RT-PCR 法で β インターフェロンの mRNA 発現量を調べた。その結果を図 1 に示す。

図 1 から明らかなように、いずれも濃度依存的に β インターフェロン mRNA を発現し、 β インターフェロンを誘導しているが、その量は、p o l y (I) ・ p o l y (C) 単独投与に比べて本発明製剤の方がより多かった。

試験例 2 肝臓以外の臓器での β インターフェロン誘導効果 (in vivo)

試験例 1 と同様にして肝臓以外の臓器での β インターフェロンの mRNA 発現量を調べた。その結果を図 2 に示す。

図 2 から明らかなように、本発明製剤は、腎臓、肺、及び脳において β インターフェロン mRNA を発現せず、 β インターフェロンをあまり誘導しなかった。

上記試験例 1 及び 2 の結果から、p o l y (I) ・ p o l y (C) 単独投与では、臓器特異性は見られなかったが、本発明製剤では、肝

臓及び脾臓で β インターフェロンを強く誘導した。

試験例 3 マウス血清中のインターフェロン量 (in vivo)

雄性マウス (Balb/c, 5 週齢) 一群 3 匹に実施例 4 に係る本発明製剤又は対照として poly(I)・poly(C) 単独製剤を静脈内投与し、3 時間後に採血して血清を得た。そして、L929細胞のウイルス (VSV) 感染による変性阻止によって血清中のインターフェロン量を測定した。その結果を表 1 に示す。

表 1 マウス血清中のインターフェロン量

| | 投与量 (μ g/kg) | インターフェロン量 (IU/ml) |
|-----------------------|----------------------|----------------------|
| コントロール | — | <3 |
| 実施例 4 | 10 | 13 \pm 2 |
| | 30 | 41 \pm 1 |
| | 100 | 63 \pm 18 |
| poly(I):poly(C) 単独 | 10 | <3 |
| | 30 | 5 \pm 2 |
| | 100 | 18 \pm 6 |

表 1 から明らかなように、いずれも投与量依存的に血清中のインターフェロンが検出されたが、本発明製剤を投与した方がより多くのインターフェロンが検出された。

本発明製剤の 100 μ g/kg 投与群の 3 時間のインターフェロン量は 63 I.U./ml であり、24 時間後でも 30 I.U./ml あった。これは、ヒト臨床において 3×10^8 I.U. の β インターフェロンを投与した場合、投与直後の血中濃度は 67 I.U./ml であり、45 分後には検出されなくなることが報告されていることから、本発明製剤が臨床的にも十分量のインターフェロンを持続的に誘導できることが示唆された。

試験例 4 毒性試験

(1) ラット単回投与による肝毒性の発現 (急性毒性試験)

6週齢SD雄性ラット8匹について実施例4に係る本発明製剤の単回静脈内投与を行い、20時間後の血清アミノシルトランスフェラーゼ活性を測定した。その結果、5 mg/kg まで死亡例は見られず、5 mg/kg で軽度の血清アミノシルトランスフェラーゼの上昇が見られた程度であった。1 mg/kg では血清アミノシルトランスフェラーゼの上昇はほとんどなかった。

(2) ラット2週間限定亜急性毒性試験

実施例4に係る本発明製剤について、SD雄性ラット6匹(6週齢)に14日間連日静脈内投与したところ、1 mg/kg 以下では特に問題となる毒性は見られなかった。

(3) 抗原性試験

実施例4に係る本発明製剤について、雄性モルモット(hartley, 5週齢)を用い抗原性試験を実施したところ、50 μ g/モルモットで抗原性は認められなかった。

(4) 簡易変異原性試験

実施例4に係る本発明製剤について、簡易復帰突然変異試験および簡易染色体異常試験を実施したところ、10 μ g/mlで変異原性は認められなかった。

図面の簡単な説明

図1は、マウスの肝臓における β インターフェロンのmRNAの発現量を示す。左端の1カラムはコントロールを表す。中央の3カラムは実施例4に係る本発明製剤の投与結果を表し、左から順に10 μ g/kg, 30 μ g/kg, 100 μ g/kg投与群を表す。右端の3カラムはpoly(I)・poly(C)単独投与結果を表し、左から順に10 μ g/kg, 30 μ g/kg, 100 μ g/kg投与群を表す。縦軸は、コントロー

ルに対する薬物投与群の β インターフェロンmRNAの発現量比を表す。

図2は、マウスの各臓器（上から順に脾臓、腎臓、肺、脳）における β インターフェロンのmRNAの発現量を示す。左端の各1カラムはコントロールを表す。中央の各3カラムは実施例4に係る本発明製剤の投与結果を表し、左から順に $10\mu\text{g/kg}$ 、 $30\mu\text{g/kg}$ 、 $100\mu\text{g/kg}$ 投与群を表す。右端の各3カラムはpoly(I)・poly(C)単独投与結果を表し、左から順に $10\mu\text{g/kg}$ 、 $30\mu\text{g/kg}$ 、 $100\mu\text{g/kg}$ 投与群を表す。縦軸は、コントロールに対する薬物投与群の β インターフェロンmRNAの発現量比を表す。

請求の範囲

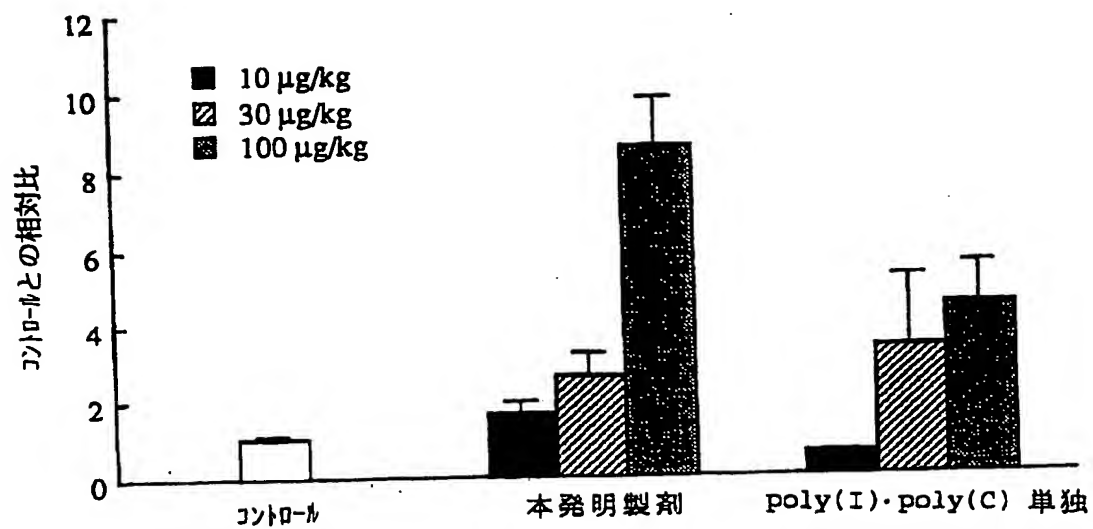
(1) カチオン性リボソームと、 $\text{poly(I)} \cdot \text{poly(C)}$ 、ミスマッチド $\text{poly(I)} \cdot \text{poly(C)}$ 、 $\text{poly(A)} \cdot \text{poly(U)}$ 、及びミスマッチド $\text{poly(A)} \cdot \text{poly(U)}$ からなる群から選択される二本鎖RNAとの複合体を含有することを特徴とする肝炎治療剤又は予防剤。

(2) 2-0-(2- ジエチルアミノエチル) カルバモイル-1,3-0- ジオレオイルグリセロール及びリン脂質を必須構成成分として形成される薬物担体と $\text{poly(I)} \cdot \text{poly(C)}$ 又はミスマッチド $\text{poly(I)} \cdot \text{poly(C)}$ の二本鎖RNAとの複合体を含有することを特徴とする肝炎治療剤又は予防剤。

(3) リン脂質がレシチンである請求項2記載の肝炎治療剤又は予防剤。

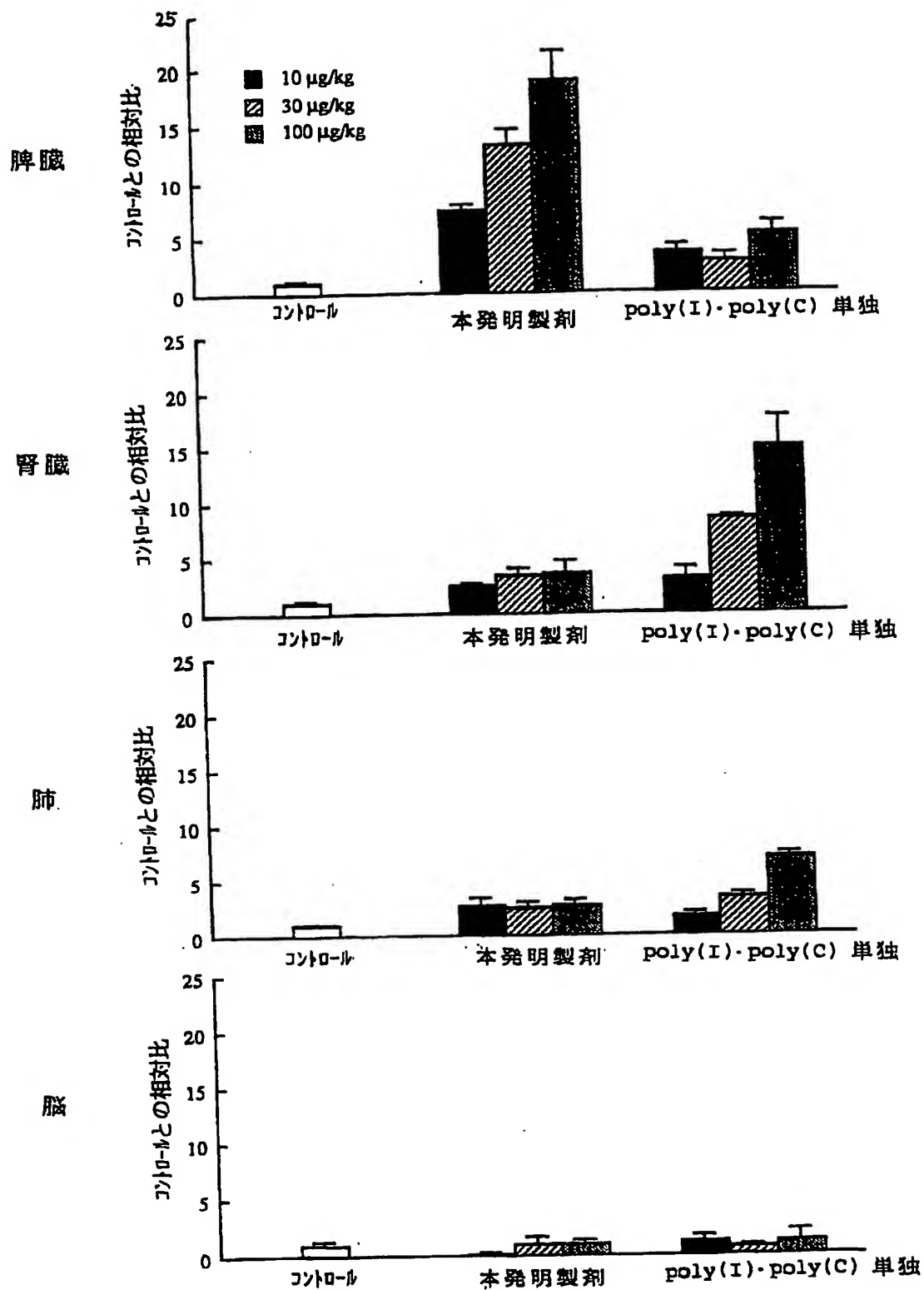
(4) 二本鎖RNAの平均鎖長が 100～500bpの範囲内である請求項1～3のいずれかに記載の肝炎治療剤又は予防剤。

(5) 2-0-(2- ジエチルアミノエチル) カルバモイル-1,3-0- ジオレオイルグリセロール及びレシチンを必須構成成分として形成される薬物担体と、平均鎖長が 100～500bp の範囲内である $\text{poly(I)} \cdot \text{poly(C)}$ との複合体を含有することを特徴とする肝炎治療剤又は予防剤。



1

2 / 2



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/01438

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁶ A61K47/24, A61K47/18, A61K9/127, A61K31/70

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁶ A61K47/24, A61K47/18, A61K9/127, A61K31/70

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA (STN), MEDLINE (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| X | Biochimica et Biophysica Acta, vol. 451, no. 2, p610-618, 1976 Wayne E. Magee et al: "A Comparison of Negatively and Positively Charged Liposomes Containing Entrapped Polyinosinic Polycytidylic Acid For Interferon Induction in Mice" Particularly refer to P611.L11-13 | 1, 4 |
| A | WO, 9418987, A1 (Nippon Shinyaku Co., Ltd), 1 September, 1994 (01. 09. 94) & EP, 685234, A1 | 2-5 |

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
21 June, 1999 (21. 06. 99)

Date of mailing of the international search report
6 July, 1999 (06. 07. 99)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.[°] A61K47/24, A61K47/18, A61K9/127, A61K31/70

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.[°] A61K47/24, A61K47/18, A61K9/127, A61K31/70

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA (STN), MEDLINE (STN)

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------|---|------------------|
| X | Biochimica et Biophysica Acta, vol. 451, no. 2, p610-618, 1976 Wayne E. Magee et al: "A Comparison of Negatively and Positively Charged Liposomes Containing Entrapped Polyinosinic · Polycytidylic Acid For Interferon Induction in Mice" 特にP611. L11~13参照 | 1, 4 |
| A | WO9418987, A1 (Nippon Shinyaku Co., Ltd) 1. 9月. 1994 (01. 09. 94) & EP685234, A1 | 2-5 |

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

- の日の後に公表された文献
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

21. 06. 99

国際調査報告の発送日

06.07.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

鶴見 秀紀

4 C 8415

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

